

2009年度 修士論文要旨

## S-S 結合でポリペプチド鎖の両端を連結したリゾチーム 変異体の部分秩序構造

関西学院大学大学院理工学研究科  
物理学専攻 瀬川研究室 笠井 健一

ニワトリ卵白リゾチームには4本のS-S結合が存在する。この全てを還元した後に、S-S結合を再生させながらリゾチームをリフォールディングさせる実験を行うと、途中で未架橋のCys残基をもつ再生中間体が現れる。この再生中間体の構造を平衡状態で調べるために、瀬川研究室では、遺伝子組み換え技術によりS-S結合を欠損させた変異体を系統的に作製して研究を行ってきた。今回、笠井はCys6とCys127間のS-S結合だけを1本保持する1SS[6-127]変異体(今後1SS-1変異体と呼ぶ)を作製し、その部分秩序構造を調べる研究を行った。129残基から成るリゾチームにおいて、タンパク質主鎖のちょうどN末端とC末端をつないだ形をとっている。

ヘリックス含量の指標となるfar-UV CDスペクトルのモル楕円率 $[\theta]_{220}$ は、水溶液中で1SS-1変異体に対してだけ僅かな違いが存在するもののその差は小さく、4種の1SS変異体に対して、どれも無秩序鎖に特徴的なCDスペクトルであった。さらにグリセロールを高濃度に添加した場合でも、一般にヘリックス含量は大きく増大するが、1SS変異体間の相違はほとんど見られなかった。一方、立体構造秩序度を示すnear-UV CDスペクトルでは、1SS-1変異体にのみ明らかな違いが現れた。グリセロール濃度が大きくなるにつれて $[\theta]_{265}$ の値が大きく減少し、 $[\theta]_{290}$ の値が僅かに増大した。これより、1SS-1の部分秩序構造は他の1SS変異体に比べて、より天然類似の構造に近づいていると推定された。さらに、誘導された部分秩序構造の程度を残基ごとに評価するため、高濃度グリセロール水溶液中で1SS-1変異体のH/D交換反応を実行し、DMSO溶液中で2次元NMRスペクトル( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC)を測定するという方法によって、NH基由来の交差ピーク体積の減少の時定数から、残基ごとのH/D交換反応に対するプロテクションファクター(P.F.)を求めた。グリセロール濃度を70%程度にしても、1SS-3(Cys64-Cys80間のS-S結合だけ存在する)や1SS-4(Cys76-Cys94が存在)変異体では、P.F.値が全残基に渡ってほぼ一様に10程度に増大するにすぎなかったのに比べて、50%グリセロール存在下の1SS-1変異体では、特定のアミノ酸残基の領域でP.F.値が100程度に増大することが分かった。その領域は、S-S結合の位置から予想されるAヘリックスやC末端の $3_{10}$ ヘリックス領域ばかりでなく、Bヘリックスや $\beta 3$ ストランド領域に及ぶことが分かった。この実験結果は、Cys6-Cys127というS-S結合が存在する場合、グリセロール添加によって誘導された2次構造間の空間的相互作用が生まれて、誘導されたヘリックス構造の安定性が特定のアミノ酸領域で増強されたということを示している。グリセロールが存在しない場合でも、ほぼ無秩序鎖の状態とはいえ、1SS変異体間の残留構造の相違は存在していて、グリセロール添加がその潜在的な相違を顕在化させたと考えている。